Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 79-93

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص.۹۳-۷۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Identification of Functional Groups, Total Phenol and Flavonoids Contents, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Aqueous Extract and Its Interactions with Chloramphenicol and Amphotericin B

E. Safari[1], H. Barzegar[2*], H. Jooyandeh[3], B. Alizadeh Behbahani[4], M. Noshad[5]

Received: 2022.01.06
Revised: 2022.02.06
Accepted: 2022.02.27
Available Online: 2022.02.27

How to cite this article:
Safari, E., Barzegar, H., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2023). Identification of functional groups, total phenol and flavonoids contents, antioxidant potential and antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) aqueous extract and its interactions with chloramphenicol and amphotericin B. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 19*(1): 79-93. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132

Introduction

The addition of chemical preservatives increases the shelf life of food products, but prolonged and indiscriminate use of chemical preservatives increases the resistance of microorganisms and the health risks associated with theiruptake. Medicinal plants have a wide variety in the world as well as in Iran. In recent years, the use of natural preservatives such as plant extracts and essential oils, due to their importance and role in controlling the growth of pathogenic microorganisms, has been proposed as an alternative to chemical preservatives. Black pepper is an aromatic medicinal plant. The specific properties of black pepper essential oil, such as its antimicrobial and antioxidant activity, have also been confirmed. Amphotericin B is one of the effective antibiotics for treating infections caused by pathogenic fungi. The mechanism of action of amphotericin B is to destroy fungal cells in such a way that by binding to ergosterol in the cell membrane of fungi, it creates pores and eventually destroys them. One of the most important and common antibiotics used in the treatment of infections caused by pathogenic bacteria is chloramphenicol. This antibiotic is effective against gram-positive and gram-negative bacteria due to its broad spectrum. The aim of this study was to identify bioactive functional groups, antioxidant potential, phenol and total flavonoid compounds and to evaluate the antimicrobial activity of black pepper extract against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans* and *Aspergillus niger*.

Materials and Methods

In this study, the antimicrobial effect of black pepper aqueous extract was investigated against *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus coagulans and Aspergillus niger* by disc diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration methods. Total phenol and flavonoid contents of the species were determined by Folin-Ciocalteu and $AlCl_3$ assays, respectively. Three biochemical assays, namely 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) free radical scavenging and β- caroten/linoleic acid activity systems, were used to evaluate antioxidant activity. Identification of functional groups as well as the structure of organic compounds in black pepper extract was also performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). To evaluate the synergistic effect of black pepper extract in combination with amphotericin B and chloramphenicol antibiotics, Sub-MIC was used.

1, 2, 3, 4 and 5- M.Sc., Associate Professor, Professor, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: hbarzegar@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132

Results and Discussion

The peaks observed in aqueous black pepper extract confirmed the presence of O-H (3000-3500 cm^{-1}), C-H (2800-3000 cm^{-1}), C=O (1613.62-1633.52 cm^{-1}) and C-O (100.57-1038.82 cm^{-1}) functional groups of bioactive compounds. The total phenol and flavonoids content of the extract were 45.12 mg GAE/g extract and its flavonoid content was 29.66 mg QUE/g extract which had an important role in its antioxidant activity. The aqueous black pepper extract had remarkable DPPH free radical scavenging activity (IC_{50}=32.37 µg/ml), ABTS free radical scavenging activity (IC_{50}=28.45 µg/ml) and beta-carotene bleaching inhibitory effect (46.45%), revealing the electron/hydrogen donating ability of the essential oil. The results of measuring the antimicrobial activity of extract by disk diffusion and agar well showed that black pepper extract showed more antimicrobial effect on gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus coagulans* than gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. This could be due to the difference in their cell wall structure. *Aspergillus niger* is the most sensitive species to aqueous black pepper extract. The minimum inhibitory concentrations of extract for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans* and *Aspergillus niger* were equal to 32, 16, 4, 8 and 4 mg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentration of black pepper extract for two bacterial species, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was more than 512 mg/ml. Also, the minimum bactericidal concentration for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus coagulans* was 128 and 256 mg/ml, respectively, and 128 mg/ml for *Aspergillus niger*. The results of interaction of black pepper extract with chloramphenicol antibiotic showed that the *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were synergistic, but antagonism was observed for the gram-positive *Bacillus coagulans*.

Keywords: Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Black pepper, Fourier transform infrared spectroscopy, Extract

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 79-93

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص. ۹۳-۷۹

مقاله پژوهشی

شناسایی گروه‌های عاملی، محتوای فنل و فلاونوئید کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی فلفل سیاه و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B

احسان صفری[۱]- حسن برزگر[۲]*- حسین جوینده[۳]- بهروز علیزاده بهبهانی[۴]- محمد نوشاد[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

چکیده

در این پژوهش، گروه‌های عاملی زیست فعال، محتوای تام فنلی و فلاونوئید، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی فلفل سیاه و همچنین برهمکنش آن با آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج طیف‌سنجی فروسرخ عصاره فلفل سیاه، پیک‌های مشاهده شده مؤید حضور گروه‌های عاملی O-H (cm^{-1} ۳۰۰۰–۳۵۰۰)، C-H (cm^{-1} ۲۸۰۰–۳۰۰۰)، C=O (cm^{-1} ۱۶۳۳/۵۲ – ۱۶۱۳/۶۲) و C-O (cm^{-1} ۱۰۳۸/۸۲ –۱۰۰۰/۵۷) ترکیبات زیست فعال بود. میزان فنل کل عصاره فلفل سیاه برابر ۴۵/۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و میزان فلاونوئید آن برابر با ۲۹/۶۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بدست آمد. نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی برحسب فاکتور IC_{50} به‌روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) به ترتیب µg/ml ۳۲/۳۷ و ۲۸/۴۵ بود. زوال رنگ بتا کاروتن برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۴۶/۴۵ درصد بدست آمد. در روش انتشار در دیسک بیشترین قطر هاله عدم رشد (۱۶ میلی‌متر) عصاره فلفل سیاه در غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بود. در روش چاهک در آگار بیشترین قطر هاله عدم رشد در کمترین غلظت (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله ۸/۴۰ میلی‌متر بود، همچنین در این غلظت هیچ گونه هاله عدم رشد برای گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* مشاهده نگردید. نتایج حاصل نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی برای *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس کواگولانس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۳۲، ۱۶، ۴، ۸ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از برهمکنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که گونه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت هم‌افزایی داشت اما برای گونه گرم مثبت *باسیلوس کواگولانس* حالت اثر کاهندگی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، فلفل سیاه، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره

مقدمه

در حال حاضر بسیاری از جوامع بشری به سمت استفاده از مواد غذایی با ویژگی‌های تازه بودن، طبیعی بودن و داشتن کمترین میزان مواد افزودنی گرایش پیدا کرده‌اند (Roman *et al.*, 2017). این ویژگی‌ها توسط بسیاری از مصرف‌کنندگان فرآورده‌های غذایی که طرفدار سلامتی هستند بیان شده است (Granata *et al.*, 2018). مطابق آمار سازمان بهداشت جهانی، هر ساله حدود ۶۰۰ میلیون نفر (تقریباً یک نفر به ازای ۱۰ نفر)، در سرتاسر دنیا پس از استفاده و مصرف غذاهای آلوده، به مسمومیت‌های گوارشی دچار می‌شوند که از این تعداد، ۴۲۰ هزار نفر به علت بیماری‌های گوارشی ناشی از عفونت و مسمومیت‌های شدید غذایی جان خود را از دست می‌دهند (WHO, 2015). فساد مواد غذایی یک فرآیند متابولیکی می‌باشدکه سبب می‌شود مواد غذایی به دلیل تغییر در ویژگی‌های حسی، برای

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: hbarzegar@asnrukh.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132

مصرف انسان نامطلوب باشند (Rawat, 2015). استفاده از مواد افزودنی خوراکی، از جمله نگهدارنده‌های سنتزی و شیمیایی، با افزایش میزان آلرژی و اختلال بیش فعالی در کودکان ارتباط مستقیم دارد (Eigenmann and Haenggeli, 2004). جلوگیری از رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و در نهایت جلوگیری و به تأخیر انداختن عوامل فساد میکروبی در مواد و فرآورده غذایی به‌طور معمول به واسطه افزودن مواد شیمیایی و سنتزی سبب افزایش عمر نگهداری محصولات غذایی می‌گردد، اما استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از نگهدارنده شیمیایی، سبب افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها و خطرات بهداشتی ناشی از مصرف آن‌ها می‌گردد (Pisoschi *et al.*, 2018).

استخراج از گیاهان، فرآیندی می‌باشد که هدف اصلی آن خارج کردن برخی از ترکیبات و اجزای موجود در گیاهان به ویژه متابولیت-های ثانویه است. از دیرباز استفاده از مشتقات گیاهی از جمله اسانس-ها و عصاره‌های آن‌ها برای اهداف مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. اهمیت و تأثیر استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد به خوبی شناخته شده است. گیاهان دارویی تنوع بسیار زیادی در سطح جهان و ایران دارند. در طی چند سال اخیر، بکارگیری و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی همانند عصاره و اسانس‌های گیاهی، با توجه به اهمیت و نقش آن‌ها در کنترل رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن به‌عنوان جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی مطرح شده است (Burt, 2004).

فلفل سیاه به‌عنوان گیاه بومی جنوب هند شناخته شده و از خانواده Piperaceae است. کشت فلفل سیاه به خاطر میوه آن است که معمولاً خشک شده و به‌عنوان یک ادویه و چاشنی استفاده می‌شود. فلفل سیاه یک گیاه معطر دارویی است. خواص مشخص اسانس فلفل سیاه، مثل فعالیت‌های ضدمیکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز تأیید شده است (Pino *et al.*, 1992). اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از بخش‌های مختلف گیاه مانند گل، جوانه، برگ، میوه، شاخه، دانه، چوب، ریشه تهیه می‌شوند. مشتقات گیاهی از مهمترین نگهدارنده‌های طبیعی محسوب می‌شوند (Minooeian Haghighi and Khosravi, 2014). فلفل سیاه را می‌توان برای اهداف مختلفی از جمله رژیم‌های غذایی انسان، به‌عنوان دارو، نگهدارنده و همچنین به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک استفاده کرد. فلفل در سراسر جهان در انواع سس‌ها و غذاهایی مانند غذاهای گوشتی استفاده می‌شود. این ماده حاوی آلکالوئید پیپرین (۱-پیروایل پیپریدین) است. از نظر دارویی فلفل سیاه را می‌توان در اختلالات گوارشی مانند سموم روده بزرگ، مشکلات مختلف معده، اسهال و سوء هاضمه استفاده کرد، همچنین این گیاه می‌تواند در برابر اختلالات تنفسی از جمله تب، سرماخوردگی، آسم استفاده شود (Fan *et al.*, 2011).

آمفوتریسین B، از جمله آنتی‌بیوتیک‌های موثر برای درمان عفونت‌های ناشی از قارچهای بیماری‌زا می‌باشد. مکانیسم عمل آمفوتریسین B جهت تخریب سلول‌های قارچی به نحوی است که با اتصال به ارگوسترول موجود در غشای سلول قارچها باعث ایجاد منافذ و در نهایت مرگ آن ها می‌شود. (Asghari *et al.*, 2010) یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بیماریزا، کلرامفنیکل می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک به دلیل وسیع الطیف بودن بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر می‌باشد.

هدف از این پژوهش، شناسایی گروه‌های عاملی زیست‌فعال، پتانسیل آنتی اکسیدانی، تعیین محتوای کل ترکیبات فنل و فلاونوئیدی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره فلفل سیاه بر *اشرشیا کلی* (ATCC 25992)، *سودوموناس ائروژینوزا* (ATCC 27853)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *باسیلوس کواگولانس* (ATCC 31284) *و آسپرژیلوس نایجر* (PTCC 5010) و برهمکنش آن با آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره فلفل سیاه

فلفل سیاه به صورت خشک شده از بازار محلی اهواز تهیه گردید. پس از تایید نام علمی گیاه توسط متخصص گیاه شناسی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، عصاره‌گیری با آب مقطر استریل به روش خیساندن (ماسراسیون) مطابق با مطالعه نوشاد و همکاران (Noshad *et al.*, 2021) انجام شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز عصاره فلفل سیاه

برای شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره فلفل سیاه از طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ استفاده گردید. در این آزمون از دستگاه Thermo Nicolet، مدل Avatar 370، ساخت آمریکا استفاده شد. طیف مورد نظر با دقت ۴ بر سانتی‌متر در محدوده ۴۰۰۰-۵۰۰ بر سانتی‌متر رسم گردید (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2019).

بررسی محتوای تام فنلی عصاره فلفل سیاه

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل عصاره فلفل سیاه از روش فولین– سیوکالتو[1] استفاده شد. جهت انجام این آزمون، ۲/۵ میلی‌لیتر فنل با ۱ میلی‌لیتر عصاره فلفل سیاه در یک لوله آزمایش با یکدیگر ترکیب شدند. پس از سپری شدن مدت زمان ۶ دقیقه میزان ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به محلول قبلی اضافه گردید و محلول مورد نظر به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت، محلول مورد نظر به دستگاه اسپکتروفتومتری منتقل گردید و میزان جذب آن در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری و اعداد آن‌ها ثبت شدند. در انتها میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره فلفل سیاه بر حسب گالیک اسید و با توجه به مقادیر به‌دست آمده از معادله حاصل از استاندارد محاسبه و نتایج آن بر حسب معادل گالیک اسید بیان شد (Dehghan *et al*., 2018).

تعیین میزان فلاونوئید عصاره فلفل سیاه

برای انجام این آزمون، ۱ میلی‌لیتر از عصاره فلفل سیاه با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شده و به آن ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد اضافه گردید. پس از سپری شدن مدت زمان ۵ دقیقه، به ترکیب قبلی ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری‌کلراید ۱۰ درصد افزوده شد. پس از افزودن آلومینیوم تری‌کلراید، محلول مورد نظر به به‌مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر سود افزوده شد و میزان جذب نمونه در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پژوهش حاضر از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده گردید. همچنین برای رسم منحنی استاندارد آن از محلول کوئرسیتین استفاده شد (Ansaripour *et al*., 2019).

ارزیابی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH[2] عصاره فلفل سیاه

در این آزمون، ۱ میلی‌لیتر از عصاره فلفل سیاه با ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی (۰/۱ میلی‌مولار)، درون لوله آزمایش با یکدیگر ترکیب شدند، سپس محلول تهیه شده در یک مکان تاریک و دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور میزان جذب نمونه‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل نمونه شاهد (آب)، در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت گردید (Alizadeh Behbahani and Shahidi., 2019). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه بر حسب درصد بازدارندگی محاسبه گردید.

ارزیابی مهار رادیکال آزاد عصاره فلفل سیاه به روش ABTS[3]

جهت ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد ABTS عصاره فلفل سیاه از روش نوروزی و همکاران (Norouzi *et al*., 2018) استفاده شد. در این روش ابتدا محلول آبی با غلظت ۷ میلی‌مولار از ABTS تهیه گردید. پس از تهیه محلول ABTS، به آن پتاسیم پرسولفات افزوده شد تا غلظت نهایی محلول به ۲/۴۵ میلی‌مولار برسد. محلول تهیه شده در مکان تاریک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور، رقیق‌سازی کاتیون رادیکال ABTS توسط متانول تا رسیدن جذب معرف به ۰/۰۲± ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام گردید. پس از انجام کارهای مذکور، ۳۰ میکرولیتر از عصاره فلفل سیاه به ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول رادیکال ABTS افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت، در نهایت جذب آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۳۴ اندازه‌گیری و گزارش گردید.

ارزیابی مهار رادیکال آزاد عصاره فلفل سیاه به روش زوال رنگ بتا-کاروتن

جهت پایش زوال رنگ محلول بتا -کاروتن /لینولئیک اسید در حضور عصاره فلفل سیاه، روش اسپکتروفوتومتری مورد استفاده قرار گرفت. جذب محلول پس از ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری (A_{120}) در ۴۹۰ نانومتر برابر نمونه کنترل در زمان صفر (C_0) و پس از ۱۲۰ دقیقه نگهداری (C_{120}) اندازه‌گیری شد. اثر بازدارندگی با استفاده از معادله ۱ به‌دست آمد (Namazi *et al*., 2021).

معادله ۱ $$[(A_{120}-C_{120})/(C_0-A_{120})]\times100 = \text{اثر بازدارندگی (٪)}$$

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره

از کلنی‌های خالص میکروارگانیسم‌های مورد بررسی، جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند استفاده شد. در این روش با استفاده از لوپ حلقوی استریل از کلنی‌های خالص یک لوپ برداشته و به لوله‌های آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی انتقال داده شدند. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید (جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱۳) و تا برابر شدن کدورت میکروبی با کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند، توسط محلول سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید. در این حالت سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم‌مک‌فارلند برابر با

1- Folin–Ciocalteu
2- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
3- (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

CFU[1]/ml ۱/۵×۱۰^۸ بود (Tanavar *et al*., 2019). به منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره فلفل، اولین روش استفاده شده، روش انتشار در آگار به کمک دیسک بود. برای انجام این آزمون پس از کشت دادن گونه‌های میکروبی روی سطح محیط مولر هینتون آگار، دیسک‌های کاغذی بلانک (دارای قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره فلفل سیاه آغشته گردید. درون هر کدام از پتری‌دیش‌ها، ۳ دیسک (۲ دیسک حاوی غلظت‌های مختلف عصاره و ۱ دیسک شاهد فاقد عصاره) قرار داده شد. برای مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره فلفل سیاه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد از آمفوتریسین B به عنوان یک آنتی بیوتیک ضدقارچ و کلرامفنیکل به عنوان یک آنتی‌بیوتیک ضدباکتری استفاده شد. پس از سپری شدن مدت زمان پیش انتشار، پتری دیش‌های حاوی باکتری‌ها و قارچ به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها، به کمک خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد (Barzegar *et al*., 2021). دومین روش اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی عصاره فلفل سیاه، روش انتشار در آگار به روش چاهک بود. در این روش مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب درون پتری دیش ریخته شد. پس از سرد شدن محیط‌های کشت، درون پتری دیش‌های استریل با کمک پی‌پت پاستور استریل شده ۳ عدد چاهک به عمق ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند روی سطح محیط کشت‌ها به صورت چمنی پخش گردید. سپس، از غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه (۱۰، ۳۰، ۵۰ و۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱۰۰ میکرولیتر به درون ۲ چاهک اطراف ریخته شد و چاهک وسط به‌عنوان شاهد (حاوی آب مقطر استریل) در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مختلف عصاره، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ گرمخانه گذاری شد. در نهایت، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها با کمک خط‌کش اندازه‌گیری شد و برحسب میلی‌متر ثبت گردید (Ansaripour *et al*., 2019).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره فلفل سیاه

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ففل سیاه، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی عصاره (۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر) به هر یاک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و سپس سوسپانسیون میکروبی (۱۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. در ادامه، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ، گرمخانه گذاری شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به چاهک‌ها اضافه گردید (برای گونه قارچی کدورت بررسی گردید). بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه، اولین خانه‌ای که تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی در آن مشاهده نگردید (عدم رشد باکتری)، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد گزارش شد. چاهک‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند برای تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از محتوای چاهک روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت پلیت‌های فاقد کلنی به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه در نظر گرفته شدند (Barzegar *et al*., 2019).

برهمکنش عصاره فلفل سیاه با دیسکهای آنتی‌بیوتیک

برای ارزیابی اثر هم‌افزایی و کاهندگی عصاره فلفل سیاه در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B و کلروامفنیکل از غلظت تحت مهاری (Sub-MIC) استفاده گردید. این غلظت‌ها معمولا برابر ۰/۵ و ۰/۲۵ حداقل غلظت مهارکنندگی می‌باشند. در پژوهش حاضر از غلظت تحت مهاری نصف حداقل غلظت مهارکنندگی ($\frac{1}{2}$ MIC) عصاره فلفل سیاه به محیط مولر هینتون آگار اضافه شد. در این روش، عصاره فلفل سیاه با محیط کشت مولر هینتون آگار با فرمول X= Sub-MIC×(19+1) با یکدیگر ترکیب شدند. سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند (CFU/ml ۱/۵×۱۰^۸) با اسفاده از سمپلر روی سطح محیط کشت بصورت چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B (۳۰ µg) و کلرامفنیکل (۳۰ µg) روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از پنس استریل قرار گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده، قطر هاله عدم رشد میکروبی با کمک خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد (Barzegar *et al*., 2019).

1- Colony Forming Unit

آنالیز آماری

در این پژوهش، تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام پذیرفت. به‌منظور مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و از آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS[1] نسخه ۲۴ استفاده گردید.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری طیف‌سنجی فرو سرخ عصاره فلفل سیاه

یکی از مهمترین روش‌های شناسایی گروه‌های عاملی و همچنین شناسایی ساختار ترکیبات آلی، استفاده از طیف‌سنجی فرو سرخ می‌باشد. نتایج مربوط به طیف‌سنجی فروسرخ عصاره فلفل سیاه در ناحیه cm^{-1} ۵۰۰–۴۰۰۰ در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در شکل ۱، مشاهده می‌گردد. پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۳۰۰۰–۳۵۰۰ مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) بوده و مربوط به گروه‌های الکلی یا اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشد. در محدوده بین cm^{-1} ۲۸۰۰–۳۰۰۰ به ویژه نوارهای پهن موجود در پیک‌های cm^{-1} ۲۹۲۷/۵۳ –۲۸۵۴/ ۶۶ مربوط به حالت‌های کششی پیوندهای C-H گروه‌های متیل (CH_3) است (Kak *et al*., 2016). وجود پیک در طول موج cm^{-1} ۱۶۳۳/ ۵۲ – ۱۶۱۳/۶۲ نشان دهنده پیوندهای کتونی (C=O) می‌باشد که مربوط به ترکیباتی همچون آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها است. وجود پیک در گستره‌ی cm^{-1} ۱۵۰۰–۱۳۰۰ نشان دهنده وجود گروه‌های C-C در حلقه آروماتیک ترکیبات پلی‌فنلی و گروه‌های OH موجود در ترکیبات فنلی در ساختار عصاره است. وجود پیک‌ها در طول‌موج cm^{-1} ۱۰۳۸/۸۲– ۱۰۰۰/۵۷ احتمالاً به دلیل ارتعاشات کششی C-O در عصاره می‌باشد.

ارزیابی میزان فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلفل سیاه

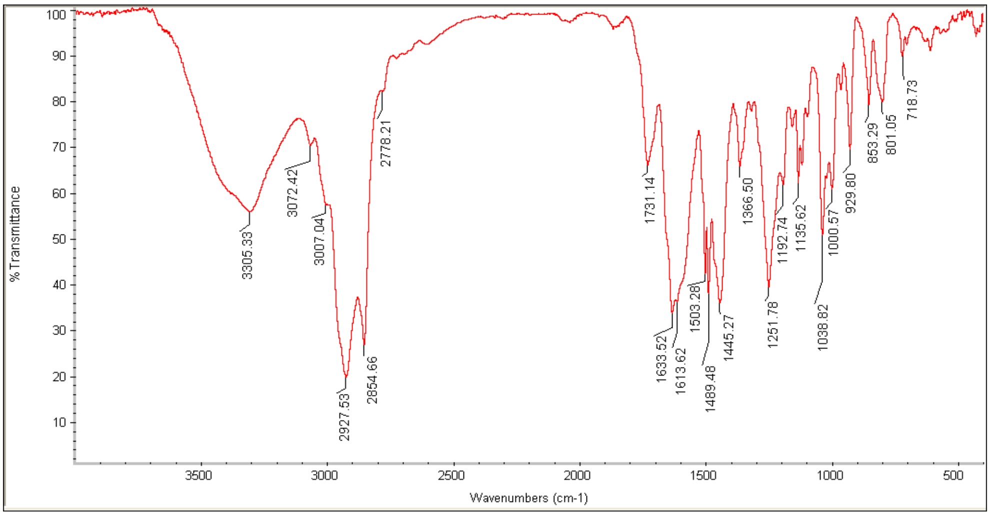
میزان فنل کل عصاره فلفل سیاه برابر ۴۵/۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و میزان فلاونوئید آن برابر با ۲۹/۶۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بدست آمد. لی و همکاران (Lee, 2020)، در طی مطالعه‌ای ترکیب شیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فلفل سیاه را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان فنل کل و فلاونوئید موجود در مطالعه آن‌ها به ترتیب ۱۴۲۱/۹۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر صد گرم فلفل سیاه و ۹۸۳/۸۲ میلی‌گرم بود. نتایج حاصل از پژوهش این محققین با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت. علت تفاوت نتیجه پژوهش حاضر با نتیجه پژوهشگران دیگر می‌تواند به جنس و گونه فلفل مورد مطالعه مرتبط باشد. بر اساس مطالعات سایر پژوهشگران، بخش عمده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهان شامل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد. این ترکیبات در قسمت‌های مختلف گیاهان وجود داشته و دارای فعالیت‌های متعدد زیستی نظیر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی می‌باشند. میزان آن‌ها به‌صورت طبیعی یا غنی‌شده در محصولات غذایی، بیانگر ارزش غذایی آن محصول جهت حفظ سلامتی مصرف‌کننده می‌باشد (Dehghan Tanha *et al*., 2018).

در پژوهش حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه به سه روش DPPH، ABTS و زوال رنگ بتا کاروتن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مربوط به این آزمون‌ها در جدول ۱، آورده شده است. در طی پژوهشی، جینا و همکاران (Jeena, 2014) اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس فلفل سیاه را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که با افزایش میزان غلظت اسانس، میزان بازدارندگی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH نیز افزایش یافت. توریان و همکاران (Tooryan, 2019) در طی مطالعه‌ای اثر کنستانتره آب نارنج و پوشش خوراکی کیتوزان غنی شده با اسانس فلفل سیاه بر بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی و حسی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که بیشترین تا کمترین میزان قدرت مهارکنندگی در پژوهش آن‌ها به ترتیب مربوط به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHT با میزان ۸۱/۹ درصد، آب نارنج با بریکس ۱/۳۹ (۶۶/۹ درصد)، اسانس فلفل سیاه ۲ درصد (۶۴/۱ درصد)، اسانس فلفل سیاه ۱ درصد (۳۹/۸ درصد)، آب نارنج با بریکس ۱/۲۴ (۳۳/۱ درصد) بود. همچنین نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که با افزایش میزان غلظت اسانس و بریکس قدرت مهار رادیکال آزاد افزایش یافت. گوپتا و همکاران (Gupta, 2014)، در طی پژوهشی بیان نمودند که ظرفیت مهار رادیکال آزاد به روش DPPH عصاره‌های آبی و متانولی فلفل سیاه به ترتیب ۳۵/۲ و ۴۵/۶۶ درصد بود. نتایج حاصل از پژوهش این محققین با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره فلفل سیاه انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی–بوئر)

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره فلفل سیاه به روش انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی–بوئر) بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در جدول ۲، آورده شده است. همانطور که نتایج نشان داد، با افزایش میزان غلظت عصاره فلفل سیاه، قطر هاله بازدارندگی از رشد نیز افزایش پیدا کرد.

1- Statistical Package for the Social Sciences



شکل ۱- طیف FTIR عصاره آبی فلفل سیاه

Fig. 1- FTIR spectrum of black pepper aqueous extract

جدول ۱- میزان فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه

Table 1- Total phenol and flavonoid content and antioxidant activity of black pepper extract

پارامتر مورد بررسی **Parameter**	مقادیر اندازه‌گیری شده **Measured Values**
فنل کل (mg GAE/g) Total phenol(mg GAE/g)	45.12 ± 0.14
فلاونوئید کل (mg QE/g) Total flavonoid (mg QE/g)	29.66 ± 0.28
مهار رادیکال DPPH (IC_{50}; µg/ml) DPPH (IC_{50}; µg/ml)	32.37 ± 0.30
مهار رادیکال ABTS (IC_{50}; µg/ml) ABTS (IC_{50}; µg/ml)	28.45 ± 0.34
بتا-کاروتن/ لینولئیک اسید (درصد) beta-carotene bleaching inhibitory effect (%)	46.45 ± 0.29

در پژوهش حاضر، میزان غلظت عصاره فلفل سیاه با میزان مهار کنندگی آن رابطه مستقیم داشت. در این مطالعه بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره فلفل سیاه در غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بود. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای دو گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* هیچ گونه قطر هاله عدم رشد مشاهده نگردید، مقایسه آماری دوتایی میان غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه نشان داد که در تمامی غلظت‌ها (۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای تمامی گونه‌ها، اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود داشت. در غلظت ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گونه باکتریایی *سودوموناس ائروژینوزا* اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نگردید. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله ۱۶ میلی‌متر بود. همچنین در این غلظت کمترین قطر هاله مربوط به باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* با قطر هاله ۱۱/۵ میلی‌متر مشاهده گردید.

در این پژوهش عصاره فلفل سیاه اثر ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس کواگولانس* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* نشان داد. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار دیواره سلولی آنها باشد. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت دارای ترکیب موکوپپتیدی می‌باشد، اما در دیواره باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه نازکی از موکوپپتید، بخش اعظمی از لیپوپروتئین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها وجود دارد که باعث مقاومت آنها می‌شود. همچنین باکتری‌های گرم منفی دارای غشای دو لایه می‌باشند به گونه‌ای که لایه پپتیدوگلیکان این باکتری‌ها در فضای پری‌پلاسمی که فضای بین غشای داخلی و خارجی می‌باشد، قرار

دارد. آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، پنیسیلینازها، فسفاتازها و فسفریله کننده آمینوگلیکوزید، ترکیبات و مولکول‌های ورودی به فضای پری پلاست را تجزیه می‌کنند. این در حالی است که، در باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود چنین فضایی، ترکیبات ضدمیکروبی می‌توانند به آسانی به دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی نفوذ کرده و باعث مرگ سلولی شوند (Noshad *et al*., 2021).

نگی و همکاران (Nagy *et al*., 2015)، در طی مطالعه‌ای که روی خاصیت ضدمیکروبی ادویجات (سیر، فلفل آنوم و فلفل سیاه) انجام دادند، بیان نمودند که قطر هاله عدم رشد فلفل سیاه بر گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب ۱۱/۷۵، ۱۲/۲۵، ۹/۷۵ و ۱۰/۵۰ میلی‌متر بود. احمدچودری و همکاران (Ahmed Chaudhry *et al*., 2006)، در طی پژوهشی اثر ضدباکتری جوشانده آبی فلفل سیاه (*Piper nigrum* L.)، برگ بو (*Laurus nobilis* L.)، انیسون (*Pimpinella anisum* L.) و گشنیز (*Coriandum sativum* L.) در برابر ۱۷۶گونه باکتریایی جدا شده از دهان ۲۰۰ نفر را مورد ارزیابی قرار دادند. در پژوهش آن‌ها از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده شد. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که جوشانده فرآورده‌های آبی فلفل سیاه دارای خواص آنتی‌باکتریایی بسیار قوی در مقایسه با سایر عصاره‌ها بود. پوندیر و همکاران (Pundir *et al*., 2010)، طی مطالعه‌ای، اثر ضدباکتری شش عصاره از دو ادویه، یعنی فلفل سیاه و زردچوبه را در سه حلال مختلف بررسی کردند. در این پژوهش، فعالیت ضدباکتریایی با روش انتشار چاهک آگار اندازه‌گیری شد. در عصاره آبی، فلفل سیاه و زردچوبه به ترتیب با قطر هاله عدم رشد، ۲۵ تا ۳۰ میلی‌متر و ۲۶ تا ۲۸ میلی‌متر فعالیت بازدارندگی خوبی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. عصاره اتانولی فلفل سیاه، فعالیت ضدباکتریایی در برابر همه باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد که قطر هاله عدم رشد بین ۱۵ میلی‌متر و ۲۲ میلی‌متر است در حالی که زردچوبه فعالیت با قطر هاله عدم رشد بین ۱۳ میلی‌متر و ۲۴ میلی‌متر نشان داد. در عصاره متانولی، قطر هاله عدم رشد در فلفل سیاه بین ۱۲ میلی‌متر و ۲۸ میلی‌متر و در زردچوبه ۱۳ میلی‌متر و ۲۲ میلی‌متر متغیر بود. فعالیت ضدمیکروبی بیشتر عصاره آبی فلفل سیاه بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به تفاوت ساختار دیواره سلولی آن‌ها نسبت داد که با پژوهش‌های علیزاده بهبهانی و همکاران (Alizadeh Behbahani *et al*., 2013) و طباطبایی یزدی و همکاران (Tabatabaei Yazdi *et al*., 2013) مطابقت داشت.

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن) عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میلی‌متر)

Table 2- Mean inhibition zone (mm) of black pepper extract on pathogenic microorganisms (disk diffusion agar)

میکروارگانیسم Microorganism	غلظت Concentration (mg/ml)			
	10	30	50	70
اشرشیا کلی *E. coli*	– [a]	7.80 ± 0.30[b]	9.00 ± 0.82[b]	11.50 ± 0.31[c]
سودوموناس ائروژینوزا *Pseudomonas aeruginosa*	– [a]	8.00 ± 0.18[a]	10.10 ± 0.19[b]	12.20 ± 0.43[c]
استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	7.30 ± 0.33[a]	9.90 ± 0.50[b]	12.80 ± 0.27[c]	15.10 ± 0.29[d]
باسیلوس کواگولانس *Bacillus Coagulans*	7.20 ± 0.37[a]	8.80 ± 0.41[b]	11.00 ± 0.46[c]	13.70 ± 0.56[d]
آسپرژیلوس نایجر *Aspergillus niger*	8.10 ± 0.33[a]	10.30 ± 0.21[b]	12.80 ± 0.30[c]	16.00 ± 0.47[d]

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

انتشار در آگار به روش چاهک

در جدول ۳، نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره فلفل سیاه به روش انتشار در آگار به روش چاهک برای پاتوژن‌های بیماری‌زای مورد بررسی آورده شده است. بیشترین قطر هاله عدم رشد در کمترین غلظت (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله ۸/۴۰ میلی‌متر بود، همچنین در این غلظت هیچ گونه قطر هاله رشد برای گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* مشاهده نگردید. در غلظت‌های بالاتر، اثر ضدمیکروبی برای تمامی گونه‌ها افزایش

قابل توجهی داشت، به نحوی که در غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* قطر هاله ۱۶/۹۰ میلی‌متر مشاهده گردید. مقایسه نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که در میان غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود ندارد (P<۰/۰۵). همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که در غلظت ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گونه باکتریایی *سودوموناس ائروژینوزا* هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نگردید.

اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی را می‌توان به ترکیبات زیست فعال موجود در آنها نسبت داد. این ترکیبات قادر به اتصال به سطح سلولی و نفوذ به لایه‌های فسفولیپیدی غشای سلولی می‌باشند. ازدیاد و انباشته شدن این ترکیبات در سلول، منجر به اختلال در یکپارچگی سلول و به دنبال آن تأثیر بر متابولیسم و در نهایت مرگ سلول می‌شود (Namazi *et al*., 2021). همچنین بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تأثیر بیشتر عصاره بر باکتری‌ها در روش چاهک آگار در مقایسه با دیسک دیفیوژن به دلیل تماس مستقیم عصاره با میکروارگانیسم‌ها در روش چاهک آگار می‌باشد، در حالی که در روش دیسک دیفیوژن به دلیل عبور از دیسک به صورت غیر مستقیم اثر بخشی آن کمتر می‌شود (Noshad *et al*., 2021).

و همکاران (Ganesh *et al*., 2014)، در پژوهشی فعالیت شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی فلفل سیاه را در برابر برخی از عوامل بیماری‌زای انسان مورد بررسی قرار دادند. در پژوهش آن‌ها ۵ گونه شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که گونه‌های *اشرشیا کلی*، سالمونلا تیفی، *پروتئوس میرابیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی فلفل سیاه واکنش نشان دادند اما *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومت نشان داد. همچنین، بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی فلفل سیاه مربوط به باکتری *اشرشیا کلی* و بیشترین قطر هاله عدم رشد در عصاره کلروفرمی مربوط گونه *پروتئوس* بود. هیکال (Hikal, 2018)، فعالیت ضدباکتریایی ترکیب پیپرین و اسانس فلفل سیاه را مورد بررسی قرار داد. در این پژوهش، روش ارزیابی اثر ضدمیکروبی با کمک چاهک آگار اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که پیپرین و اسانس فلفل سیاه روی تمام گونه‌های باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر ضدباکتریایی بود. قطر هاله عدم رشد برای ترکیب پیپرین ۸/۲۳ تا ۱۸/۱ میلی‌متر و برای اسانس فلفل سیاه ۳/۱۴ تا ۱۰/۴۳ میلی‌متر متغیر بود. شیواریانی و همکاران (Rani Shiva *et al*., 2013)، فعالیت ضدمیکروبی فلفل سیاه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که حداکثر قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۸ میلی‌متر و حداقل قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری‌های گرم منفی *اشرشیاکلی*، ۸ میلی‌متر بود.

جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میلی‌متر)

Table 3- Mean inhibition zone (mm) of black pepper extract on pathogenic bacteria (well diffusion agar)

میکروارگانیسم Microorganism	غلظت Concentration (mg/ml)			
	10	30	50	70
اشرشیا کلی *E. coli*	–[a]	7.90 ± 0.28[b]	9.90 ± 0.13[b]	12.90 ± 0.42[c]
سودوموناس ائروژینوزا *Pseudomonas aeruginosa*	7.4 ± 0.19[a]	8.30 ± 0.37[a]	11.00 ± 0.46[b]	13.10 ± 0.48[c]
استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	8.10 ± 0.50[a]	10.80 ± 0.67[b]	13.10 ± 0.35[c]	16.30 ± 0.68[d]
باسیلوس کواگولانس *Bacillus Coagulans*	7.60 ± 0.14[a]	9.50 ± 0.37[b]	11.80 ± 0.60[c]	14.00 ± 0.20[d]
آسپرژیلوس نایجر *Aspergillus niger*	8.40 ± 0.31[a]	10.60 ± 0.49[b]	13.30 ± 0.66[c]	16.90 ± 0.50[d]

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده اند.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

همچنین حداکثر فعالیت ضدقارچی نسبت به *فوزاریم آکسیسپورم*، ۱۴ میلی‌متر و کمترین اثر را در برابر *آسپرژیلوس نایجر*، ۳۸ میلی‌متر نشان داد. دورمن و همکاران (Dorman *et al*., 2000)، در طی پژوهشی نشان دادند که که عصاره گیاهی فلفل سیاه دارای اثر ضدباکتریایی علیه گونه *استافیلوکوکوس اورئوس بود*. در پژوهش آن-ها قطر هاله عدم رشد عصاره فلفل سیاه ۱۵ میلی‌متر بود. همچنین این عصاره در رقت ۲۵ میلی‌لیتر سبب مرگ این باکتری گردید. کارشا و همکاران (Karsha *et al*., 2010)، اثر بازدارندگی عصاره استونی فلفل سیاه در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *انتروکوک فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا تیفی* نشان داده است که این عصاره به ترتیب با غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵۰، ۰/۵، ۶/۲۵، ۱/۲۵، ۱/۲۵ و ۲/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین قطر هاله عدم رشد هاله را دارد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره فلفل سیاه

نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه برای پاتوژن‌های بیماری‌زا در جدول ۴ آورده شده است. نتایج حاصله نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی برای پاتوژن‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس کواگولانس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۳۲، ۱۶، ۴، ۸ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین میزان بازدارندگی عصاره فلفل سیاه مربوط به گونه گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بود و کمترین میزان بازدارندگی مربوط به گونه گرم منفی *اشرشیا کلی* با میزان ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج مربوط به حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه در جدول ۴ آورده شده است. همانطور که در جدول نشان داده شده است حداقل غلظت کشندگی برای دو گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بیش از غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی برای گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس کواگولانس* به ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید.

صباغ و همکاران (Sabbagh *et al*., 2015)، بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی فلفل سیاه و اسفند علیه گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که بیشترین و کم‌ترین مقاومت به ترتیب متعلق به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم با میزان ۶۶/۶ درصد و وانکومایسن به میزان ۸/۱ درصد می‌باشد. ارزیابی مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی نشان داد که بیشترین اثر کشندگی فلفل و اسپند به ترتیب در غلظت ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که کمترین غلظت بازدارندگی در غلظت ۲/۵، ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. بیشترین مقدار حداقل غلظت کشندگی به ترتیب در غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌های فلفل سیاه و اسفند مشاهده شد.

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

Table 4- Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of black pepper extract on pathogenic microorganisms

میکروارگانیسم Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)
اشرشیا کلی *E. coli*	32	>512
سودوموناس ائروژینوزا *Pseudomonas aeruginosa*	16	>512
استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	4	128
باسیلوس کواگولانس *Bacillus Coagulans*	8	256
آسپرژیلوس نایجر *Aspergillus niger*	4	128

MIC= Minimum inhibitory concentration
MBC= Minimum bactericidal concentration
MFC= Minimum fungicidal concentration

برهمکنش عصاره فلفل سیاه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک

نتایج مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی کلرامفنیکل و آمفوتریسین B و همچنین برهمکنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در جدول ۵ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل مربوط به گونه *باسیلوس کواگولانس* با قطر ۲۱/۲۰ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* ۱۶/۶۰ میلی‌متر بود. نتایج حاصل از برهم‌کنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که برای گونه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت سینرژیستی وجود داشت اما برای گونه گرم مثبت *باسیلوس کواگولانس* حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید. همچنین مشاهده گردید که اثر برهم‌کنش عصاره فلفل سیاه و آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* حالت سینرژیستی بود. عبدل تواب و همکاران (Abd EL-Tawab *et al*., 2017)، در پژوهشی فعالیت ضدمیکروبی و هم‌افزایی عصاره فلفل سیاه درترکیب آنتی-بیوتیک روی *اشرشیاکلی* جدا شده از مرغ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که در حالت ترکیب عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، داکسی‌سایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین و سفوتاکسیم، حالت افزایشی (سینرژیستی) مشاهده گردید.

جدول ۵- اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B به تنهایی و توام (برهم‌کنش) با عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی برحسب میلی‌متر)

Table 5- Antimicrobial effect of chloramphenicol and amphotericin B and their interaction with black pepper extract on pathogenic microorganisms

میکروارگانیسم Microorganism	ماده ضدمیکروب Antimicrobial agent			
	کلرامفنیکل Chloramphenicol	آمفوتریسین B Amphotericin B	کلرامفنیکل + عصاره Chloramphenicol + Extract	آمفوتریسین B + عصاره Amphotericin B + Extract
اشرشیا کلی *E. coli*	14 ± 0.44 [a]	-	17.80 ± 0.72 [a]	-
سودوموناس ائروژینوزا *Pseudomonas aeruginosa*	15.20 ± 0.36 [a]	-	18.30 ± 0.36 [b]	-
استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	19.30 ± 0.68 [a]	-	24.40 ± 0.30 [b]	-
باسیلوس کواگولانس *Bacillus Coagulans*	21.20 ± 0.37 [a]	-	11.60 ± 0.50 [b]	-
آسپرژیلوس نایجر *Aspergillus niger*	-	16.60 ± 0.52 [a]	-	18.90 ± 0.38 [b]

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند..

حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره آبی فلفل سیاه دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های DPPH، ABTS و میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن) نشان داد که عصاره فلفل سیاه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. نتایج آزمون‌های میکروبی نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی برای *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس کواگولانس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۳۲، ۱۶، ۴، ۸ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه نشان داد که حداقل غلظت کشندگی برای دو گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بیش از غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی برای گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و

باسیلوس کواگولانس به ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. بیشترین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل مربوط به گونه *باسیلوس کواگولانس* با قطر ۲۱/۲۰ میلی‌متر و قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* ۱۶/۶۰ میلی‌متر بود. نتایج حاصل از برهمکنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که برای گونه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت سینرژیستی وجود داشت اما برای گونه گرم مثبت *باسیلوس کواگولانس* حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید. همچنین نیز مشاهده گردید که اثر برهمکنش عصاره فلفل سیاه و آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* حالت سینرژیستی بود. در ادامه پیشنهاد می‌گردد پژوهش‌های بیشتری در زمینه تاثیر عصاره‌های مختلف فلفل سیاه بر سایر میکروارگانیسم‌ها نیز بررسی شده و اثر آن بر نگهداری مواد غذایی مختلف بررسی گردد تا بتوان از پتانسیل ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا بهره برد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Abd EL-Tawab., A, Ahmed, Ammar, M.A., Hamouda, M.A., El-Hofy, F., & Elgamal, A. (2017). Synergistic antimicrobial activity of black pepper extract with some antibiotics combination on *Escherichia coli* isolated from chickens. *Benha Veterinary Medical Journal 32*(1): 1–6. https://doi.org/10.21608/bvmj.2017.31104.
2. Ahmed Chaudhry, N.M., & Tariq, P. (2006). Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 19*(3): 214-8.
3. Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2019). *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research 6*(1): 17-25. http://doi.org/10.29252/nfsr.6.1.17.
4. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M., & Vasiee, A. (2013a). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. *Archives of Advances in Biosciences 4*(3): 89-99.
5. Ansaripour, A., Mehrnia, M.A., Noshad, M., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2019). Antimicrobial effect of garlic essential oil on a number of foodborne pathogens and determination of its chemical composition and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology (Iran) 91*(16): 17-29.
6. Asghari ,M.H., Gharib, A., & Faezizadeh, Z. (2010). In vitro anti-fungal and toxicity of spray-dried amphotericin B-loaded poly lactideglycolide nanocapsules. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 18*(3): 19-28.
7. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2019). Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of Food Science and Technology (Iran) 90*(16): 113-125.
8. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of Lawsonia inermis aqueous extract against some Gram- positive and Gram- negative bacteria. *Journal of Food Science and Technology (Iran) 116*(18): 327-335. http://doi.org/10.52547/fsct.18.116.327.
9.Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
10. Dehghan Tanha, R., Aminifard, M.H., & Bayat, H. (2018). Effect of ultrasound on extraction of carotenoids of lycopene and beta-carotene from chili pepper fruit and response surface optimization of extraction conditions. *Journal of Food Science and Technology (Iran) 72*(14): 177-185.
11. Dehghan, N., Barzegar, H., Mehrnia, M.A., & Jooyandeh, H. (2018). Investigation on the effect of Methanolic Bene (*pistachia atlantica*) hull extract on oxidative stability of soybean oil, *Innovative Food Technologies 5*(3): 499-507. https://doi.org/10.22104/jift.2018.2577.1607.
12. Dorman, H., & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology 88*(2): 308-16. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
13. Eigenmann, P.A., & Haenggeli, C.A. (2004). Food colourings and preservatives- allergy and hyperactivity. *Lancet* 364: 823-824. https://psycnet.apa.org/doi/10.1016/S0140-6736(04)16996-1.

14. Fan, L.S., Muhmad, R., Omar, D., & Rahimani, M. (2011). Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 517-522. https://doi.org/10–500/ZIP/2011/13–4–517–522.
15. Ganesh, P., Suresh Kumar, R,. & Saranraj, P. (2014). Phytochemical analysis and antibacterial activity of Pepper (*Piper nigrum* L.) against some human pathogens. *Central European Journal of Biology 3*(2):36-41.
16. Granata, G., Stracquadanio, S., Leonardi, M., Napoli, E., & Consoli, G.M.L. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry* 269: 286-292. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140.
17. Gupta, K.R., Chawla, P., Tripathi, M., Shukla, K.A., & Pandey, A. (2014). Synergistic antioxidant activity of tea with ginger, black pepper and tulsi. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6*(5): 477-479. https://doi.org/10.4103%2F2231-4040.85538.
18. Hikal, D.M. (2018). Antibacterial activity of piperine and black pepper oil. *Biosciences Biotechnology Research Asia 15*(4): 877-880. http://doi.org/10.13005/bbra/2697.
19. Jeena, K., Liju, V.B., Umadevi, N., & Kuttan, R. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of black pepper essential oil (*Piper nigrum* L.). *Journal of Essential oil Bearing Plants* 17: 1-12. https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.831562.
20. Kak, M., Abdulkadhim, H.M. & Noori, S.I. (2016). Chemical composition and anti-bacterial effects of clove (*Syzygium aromaticum*) flowers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 5*(2): 483-489. http://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.054.
21. Karsha, P.V., & Lakshmi, O.B. (2010). Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) with special reference to its mode of action on bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources 1*(2): 213-15.
22. Lee, J.G., Chae, Y., Shin, Y., & Jun Kim, Y. (2020). Chemical composition and antioxidant capacity of black pepper pericarp. *Biological Chemistry 63*(35): 1-9. https://doi.org/10.1186/s13765-020-00521-1.
23. Minooeian Haghighi, M.H., & Khosravi, A. (2014). Effects of anti-aflatoxin of essential oils of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa*. *International Journal of Food Microbiology* 13: 396-404.
24. Nagy, M., Sonia, A., Socacl Tofana, M., Carmen, P, Muresan, C., Viorica, A., Salanta, L., & Ancuta, M. (2015). Determination of total phenolics, antioxidant capacity and antimicrobial activity of selected aromatic spices. *Napoca Food Science and Technology 72*(1):83-85. https://doi.org/ 10.15835/buasvmcn-fst:11094.
25. Namazi, P., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2021). Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts. *Journal of Food Science and Technology (Iran) 113*(14): 301- 311. http://doi.org/10.52547/fsct.18.113.301.
26. Norouzi, F., Hojjati, M., Jooyandeh, H., & Barzegar. (2018). Study of the possibility of application of tarragon essential oil in mayonnaise as a natural additive. *Journal of Food Research 25*(3): 85-99.
27. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Barzegar, H. (2021). Determiniation of the antioxidant and antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of *Echinacea angustifolia* against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Iranian Journal of Infectious Diseases* 93: 44-53.
28. Pino, J., Borges, P., & Sanchez, R. (1992). Alcohol deterpenation of black pepper. *International Journal of Food Science and Technology 27*(5): 551–555.
29. Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcus, V., Olah, N.K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143: 922–935. http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095.
30. Pundir, R.K, & Jain, P. (2010). Comparative studies on the antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum*) and extracts. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 1*(2): 492-500.
31. Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5: 47-56.
32. Roman, S., Sanchez-Siles, L.M., & Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science & Technology* 67: 44-57. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.010.
33. Sabbagh, S.K., Dehbashi, S., & Mazaheri Naeeni, M. (2015). Antimicrobial activity of ethanolic extract of black pepper (*Piper nigrum*) and march (*Peganum harmala*) against antibiotic-resistant of *Staphylococcus aureus* strains, bimonthly. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 22*(5): 854-861.
34. Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on Gram positive and Gram negative bacteria “in vitro”. *Archives of Advances in Biosciences 4*(4): 56-62. https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74472.1130.
35. Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2020). Evaluation of the antimicrobial activity of *Mentha pulegium* essential oil on some foodborne pathogens and its interaction with gentamicin and

chloramphenicol in vitro, *Journal of Food Science and Technology (Iran) 97*(16): 77-87. http://doi.org/10.29252/fsct.16.97.77.

36. Tooryan, F., & Azizkhani. M. (2019). Effect of orange juice concentrate and chitosan coating enriched with black pepper (*Piper nigrum*) essential oil on improvement of antioxidant and sensory properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 15*(2): 381-394. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v15i2.71775.
37. WHO. (2015b). Country statistics (http://www.who.int/gho/countries/brn.pdfua=1